Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. R.-E. Bader

# Untersuchungen mit Bakterienstämmen einer vorläufig als „PASTEURELLA X" bezeichneten Bakterienart

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
MAREN STRUVE
aus Schleswig

1963

7696

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. R.-E. Bader

# Untersuchungen mit Bakterienstämmen einer vorläufig als „PASTEURELLA X" bezeichneten Bakterienart

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
MAREN STRUVE
aus Schleswig

1963

Dekan: Professor Dr. med. Dr. med. dent. E. Fröhlich

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. W. Knapp

2. Berichterstatter: Professor Dr. med. R. -E. Bader

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Fotodruck PRÄZIS · Tübingen

Inhaltsverzeichnis


Seite

I. Einleitung 2

II. Eigene Untersuchungen 5

A. 1) Morphologie 5

a) Präparate von Kulturen in flüssigen Medien 6

b) Präparate von Kulturen auf festen Nährböden 6

2) Beweglichkeitsprüfung 7

Tabelle I 8

B. Verhalten gegenüber verschiedenen Umweltseinflüssen 8

1) Prüfung der Überlebensdauer der "Pasteurella X"-Stämme auf verschiedene Kulturmedien und bei verschiedener Bebrütungstemperatur 8

2) Resistenz gegenüber Sulfonamiden und Antibiotika 10

Tabelle II 13

C. Wachstum auf festen Nährmedien 14

1) Blutagar 16

2) Milchzuckersulfitagar (nach Endo) 17

3) Desoxycholatcitratagar (nach Leifson) 17

4) Laktose-Galle-Medium (nach Mac Conkey) 17

5) Wismut-Sulfit-Agar (nach Wilson und Blair) 18

6) Tellurit-Blutwasser-Glycerolat-Agar (Clauberg II-Medium) 18

7) Pasteurellen-Agar (nach Morris) 18

Tabelle III 19

Seite


D. Biochemische Eigenschaften 20

a) Aesculin 21

b) Malonat (nach Leifson, modif. nach Ewing) 21

c) Urease 22

d) KCN-Test 23

e) ß-Galaktosidase (nach Le Minor und Ben Hamida) 23

f) Prüfung von Oxydationsvorgängen (Katalase- Oxydase- Peroxydase-Teste) 24

g) Prüfung der Decarboxylaseaktivität 26

Tabelle IV 31

Tabelle V 33

E. Unterschiede im kulturellen und biochemischen Verhalten von "Pasteurella X" und Past. pseudotuberculosis 35

Tabelle VI 36

F. Serologische Untersuchungen mit "Pasteurella X"-Stämmen 38

G. Tierexperimentelle Untersuchungen 40

III. Stellungnahme zu den Untersuchungen und ihren Ergebnissen 42

IV. Zusammenfassung 46

V. Literaturangaben 48

## I. Einleitung

Untersuchungen über die Pseudotuberkulose der Chinchillas ließen Becht (1962) bei 24 von 151 im Jahre 1961 bakteriologisch untersuchten Kadavern einen Bakterienstamm finden, der sich in verschiedenen kulturell-biochemischen, serologischen und tierexperimentellen Eigenschaften von Past. pseudotuberculosis unterschied. Einige Zeit später berichteten Daniels und Mitarbeiter (1963) ohne Kenntnis der Veröffentlichung von Becht über ähnliche Beobachtungen. Sie hatten 9 Stämme von Chinchillas und einen Stamm von einem Hasen, die auf Grund der kulturell-biochemischen Voruntersuchungen zuerst als Past. pseudotuberculosis bestimmt worden waren, zur serologischen Typisierung erhalten. Da keiner der Stämme in den mit Past. pseudotuberculosis Typ I - V hergestellten Typensera agglutinierte, führten auch Daniels und Mitarbeiter (1963) kulturell-biochemische, serologische und tierexperimentelle Untersuchungen durch. Sie fanden, daß sich die 10 und 2 weitere von Hässig und Mitarbeitern (1949) beschriebenen Stämme menschlicher Herkunft in ihren kulturell-biochemischen und tierexperimentellen Eigenschaften weitgehend entsprachen und serologische Beziehungen untereinander aufwiesen. Daniels bezeichnete die Stämme, deren endgültige Systematisierung weitere Vergleichsuntersuchungen an einem größeren Stammaterial voraussetzte, als "Pasteurella X". Gegen ihre zuerst angenommene Zugehörigkeit zur Species Past. pseudotuberculosis sprachen das unterschiedliche kulturell-biochemische und tierexperimentelle Verhalten, die fehlende Lysierbarkeit durch den PST-Phagen und ihre Inagglutinabilität in den Typensera von Past. pseudotuberculosis Typ I - V.

Schließlich isolierte Privatdozent Dr. Siegmann (Bundesforschungsanstalt für Kleintierzüchtung, Celle) zur gleichen Zeit, wiederum bei Chinchillas, Stämme, die Past. pseudotuberculosis ähnlich waren. Er überließ einige Stämme

Prof. Knapp (Hygiene-Institut Tübingen) zur endgültigen Differenzierung. Weitere Chinchilla-Stämme wurden von Dr. Frederiksen (Staatl. Seruminstitut, Kopenhagen) gefunden, der sie ebenfalls zu Nachuntersuchungen freundlicherweise zur Verfügung stellte.

Aufgabe dieser Arbeit war es, durch Untersuchung eines größeren Stammaterials weitere Unterlagen vor allem über die morphologischen, kulturell-biochemischen und tierexperimentellen Eigenschaften dieser Stämme zu gewinnen und diese gegenüber Past. pseudotuberculosis abzugrenzen.

Für die Untersuchungen standen der größte Teil der auch von Knapp und Thal (1963) untersuchten Stämme zur Verfügung, die nach ihrem Herkunftsbereich in folgende Gruppen eingeteilt wurden:

14 Schweizer Stämme, überlassen von Dr. Becht, Veterinär-Bakteriologisches Institut der Universität Zürich.

Bezeichnung der Chinchilla-Stämme:
Nr. 13, 18, 49, 51, 57, 59, 71, 85, 115, 122, 134, 151, 157.

Bezeichnung des Hundestammes:
Nr. 200 (Protokoll Nr. des Hygiene-Instituts Tübingen).

10 Holländische Stämme, überlassen von Dr. Daniels, St. Franziskus Hospital, Rotterdam.

Bezeichnung der Chinchilla-Stämme:
Nr. 905, 924, 931, 975, 1046, 1054, 1055, 1078, 1165.

Bezeichnung des Hasenstammes:
Nr. 1028.

3 Dänische Stämme, überlassen von Dr. Frederiksen, Staatl. Seruminstitut Kopenhagen.

Bezeichnung der Chinchilla-Stämme:
Nr. P 71, P 76, P 77.

11 Deutsche Stämme, überlassen von Privatdozent Dr.Siegmann, Bundesforschungsanstalt für Kleintierzüchtung Celle.

Bezeichnung der Chinchilla-Stämme:
Nr. 266, 267, 268, 271, 612, 709, 988, 1100, 1154, 1524, 2737.

1 Stamm menschlicher Herkunft, Sammlung des Hygiene-Instituts Tübingen, überlassen von Prof. Grumbach, Hygiene-Institut Zürich. Isoliert von Dr. Hässig und Mitarbeiter (1949).

Bezeichnung des Stammes:
Nr. 2533.

Sämtliche Stämme waren freundlicherweise Herrn Prof. Knapp für eigene Untersuchungen zur Verfügung gestellt und in die Sammlung des Hygiene-Instituts Tübingen übernommen worden, aus der auch die Stämme von Past. pseudotuberculosis stammten.

## II. Eigene Untersuchungen

### A. 1) Morphologie

Zur Bestimmung der Morphologie und Färbbarkeit der "Pasteurella X"-Stämme wurden zuerst von allen Stämmen Ausstrichpräparate von 24 Std. bei 22°C bebrüteten Bouillonkulturen gemacht. Die hitze- bzw. alkoholfixierten Präparate wurden nach Gram bzw. mit Methylenblau gefärbt. Die Methylenblaufärbung diente vor allem dem Nachweis von Polen, der für Keime der Gattung Pasteurella charakteristisch sein soll. Bei diesen Färbungen zeigten die "Pasteurella X"-Stämme kokkoide, ovoide oder elliptische und längliche Stäbchenformen; Polkörperchen wurden, wenn überhaupt, vor allem bei den Kurzformen nachgewiesen. Nur vereinzelt sah man die Stäbchen, die in der Regel einzeln lagen, auch kurze Ketten bilden. Auffallend war, daß vor allem bei Stamm Nr. 1078 (Daniels) in den Bouillonkulturen außer den kurzen plumpen auch lange, schlanke Stäbchen in großer Zahl auftraten. Alle Stämme waren gramnegativ.

Morphologische Unterschiede gegenüber Past. pseudotuberculosis ließen sich bei diesen Untersuchungen nicht nachweisen. Diese Feststellung gilt auch für die Ausstrichpräparate, die von den auf festen Nährmedien bei 22°C und 37°C gezüchteten Stämmen hergestellt worden waren.

Zur Prüfung der Frage, ob eine Änderung der Bebrütungstemperatur die Morphologie der "Pasteurella X"-Stämme beeinflußt, überimpften wir die Stämme Nr. 905 und 1078 (Daniels) in Nährbouillon und Proteoselösung (Difco Nr. B 65). Die Bebrütung der Kulturen erfolgte nunmehr außer bei 22°C auch bei 37°C. Nach 12 und nach 24 Stunden wurden Ausstrichpräparate hergestellt, die mit Alkohol fixiert und mit Methylenblau gefärbt wurden. Außerdem wurden von Kulturen auf Nähragar- und Milchzuckersulfitagarplatten nach 12, 24 und 36 stündiger Bebrütung bei 22°C und 37°C Methylenblaupräparate her-

gestellt. Zum Vergleich dienten uns Ausstrichpräparate von Past. pseudotuberculosis Stamm $2^{I}$ und $32^{IV}$, die unter entsprechenden Bedingungen gezüchtet worden waren.

Diese Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen.

a) Präparate von Kulturen in flüssigen Medien:

Wurden die Kulturen der "Pasteurella X"-Stämme in Proteoselösung bei 37°C bebrütet, so zeigten die einzelnen Stämme schon nach 12 Stunden Bebrütung bei der Färbung mi Methylenblau eine starke Pleomorphie. Neben kurzen plumpen, mehr ovoiden Stäbchen wurden zahlreiche längliche, schlanke Stäbchen beobachtet. Die Stäbchen lagen in der Regel einzeln und bildeten nur selten kurze Ketten. Wurden die Kulturen bei 22°C bebrütet, so waren nach 12 Stunden vor allem kokkoide und ovoide Stäbchen nachzuweisen, während kurze plumpe oder elliptisch geformte Stäbchen mit abgerundeten Enden und deutlichen Polkörperchen in der Regel erst nach 24 Stunden auftraten. Sie lagen auch bei 22°C meist einzeln oder in Haufen und nur sehr selten in kurzen Ketten. Der Nachweis von Polkörperchen war unregelmäßig.

b) Präparate von Kulturen auf festen Nährböden:

Mikroskopisch war kein sicherer morphologischer Unterschied zwischen den auf Endo- oder Nähragar bei 37°C bzw. bei 22°C gewachsenen Bakterien erkennbar. Die 22°C-Kulturen auf festen Medien ließen bei den Keimen die Polkörperchen nicht so deutlich erkennen wie die unter gleichen Bedingungen im flüssigen Medium gewonnenen Kulturen. Wurden die Kulturen bei 37°C gezüchtet, so blieb ein Nachweis von Polkörperchen aus. Eine Lagerung der Keime in kurzen Ketten oder Entwicklung von Degenerationsformen wurde mit zunehmender Bebrütungsdauer der Kulturen gesehen. Besonders häufig sahen wir die Degenerationsformen wiederum bei Stamm Nr.1078 (Daniels).

Eine Erhöhung der Bebrütungstemperatur von 22°C auf 37°C scheint somit auch bei "Pasteurella X"-Stämmen die Entwicklung größerer Stäbchen- und Degenerationsformen zu fördern. Die Beobachtung von Daniels (1963), daß sich die pleomorphen Past. pseudotuberculosis- und "Pasteurella X"-Stämme morphologisch nicht unterscheiden lassen, wurde somit durch unsere Untersuchungen bestätigt.

2) Beweglichkeitsprüfung:

Sie ging von der Frage aus, ob alle "Pasteurella X"-Stämme beweglich sind, und ob wie bei Past. pseudotuberculosis die Bebrütungstemperatur der Kulturen einen Einfluß auf die Beweglichkeit hat.

Zur Prüfung der Beweglichkeit wurden U-Röhrchen mit SIM-Medium (Difco Nr. B 271) mit den verschiedenen Stämmen beimpft und bei 22°C und 37°C bebrütet. Stämme, die anfänglich keine Beweglichkeit zeigten, wurden in U-Kölbchen nach Bader (1959) geprüft. Eine Zusammenstellung dieser Ergebnisse bringt Tabelle I (Seite 8).

Tabelle I

Beweglichkeitsprüfung im U-Röhrchen

| Bebrütungstemperatur | Anzahl und Herkunft der " Pasteurella X"-Stämme | | | | Past.pseudotuberculosis-Stämme |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1 (Hässig) | 11 (Siegmann) | 10 (Daniels) | 14 (Becht) | 8 (Sammlung Hyg.Inst. Tübingen) |
| 37°C | - | - | - | - | - |
| 22°C | + | + | + | + | + |

Zeichenerklärung:
+ = beweglich - = unbeweglich

Die Gegenüberstellung zeigt, daß alle 36 untersuchten "Pasteurella X"-Stämme bei 22°C beweglich und bei 37°C unbeweglich waren. Die meisten Stämme durchschwärmten das U-Röhrchen bei 22°C schon innerhalb 24 Stunden. Eine Ausnahme zeigte vor allem Stamm Nr. 1028 (Daniels), dessen Beweglichkeit nur in einem Ansatz nachgewiesen werden konnte. Bei späteren Untersuchungen sahen wir kein Durchschwärmen des U-Röhrchens mehr.

B. Verhalten gegenüber verschiedenen Umwelteinflüssen:

1) Prüfung der Überlebensdauer der "Pasteurella X"-Stämme auf verschiedenen Kulturmedien und bei verschiedener Bebrütungstemperatur.

Zweck dieser Untersuchungen war die Prüfung der Frage, wie rasch die "Pasteurella X"-Stämme in Abhängigkeit von der Art des verwendeten Nährmediums und der Bebrütungs- oder Aufbewahrungstemperatur absterben, und ob sich Unterschiede

in ihrem Verhalten und dem der Past. pseudotuberculosis-Stämme feststellen lassen.

Folgende Versuchsanordnung wurde gewählt:

36 "Pasteurella X"- und 7 Past. pseudotuberculosis-Stämme wurden jeweils in Kölbchen mit 75 ml Proteoselösung überimpft und bei 37°C bebrütet. Von diesen Ausgangskulturen, die bei 37°C gehalten wurden, beimpften wir nach 3 und 7 Tagen Blutagarplatten, die nach 48 Stunden Bebrütung bei 37°C im Kühlschrank bzw. bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurden. Außerdem beimpften wir Proteoseschrägagarröhrchen, die gleichfalls bei Zimmer- und Kühlschranktemperatur gehalten wurden. Nur die bei Zimmertemperatur aufbewahrten Schrägagarkulturen wurden zuparaffiniert. Das Überleben bzw. Absterben der verschiedenen Kulturen wurde durch Abimpfungen in Bouillonröhrchen und Kontrolle des Wachstums überprüft.

Die Untersuchungsergebnisse können wie folgt zusammengestellt werden:

a) In Proteoselösung überlebten bei 37°C alle "Pasteurella X"- und Past. pseudotuberculosis-Stämme 7 Wochen. Nach 11 Wochen waren 3 "Pasteurella X"-Stämme (Nr.49, 71, 122), nach 15 Wochen 36 Stämme (überlebende "Pasteurella X"-Stämme: Nr. 267, 905, 1055, 57, 115, 151; überlebender Past. pseudotuberculosis-Stamm: Nr. 2067) und nach 19 Wochen alle Stämme abgestorben. Innerhalb dieser Zeit war auch der größte Teil der Kulturflüssigkeit eingetrocknet, da die Kulturkölbchen nur mit einem Zellstoffstopfen verschlossen waren.

b) Auf Blutagarplatten überlebten bei 22°C alle 43 Stämme 2 Wochen. Nach 4 1/2 Wochen waren 21 Stämme und nach 6 Wochen 40 Stämme - außer "Pasteurella X"-Stamm Nr. 271, 612, 709 - abgestorben. Zu dieser Zeit waren auch die Blutagarplatten fast ganz eingetrocknet.

Wurden die Blutagarplatten im Kühlschrank aufbewahrt, überlebten alle Kulturen eine Kontrollzeit von 13 Wochen. Nach 17 Wochen waren nur die 3 "Pasteurella X"-Stämme Nr. 49, 71 und 1524 abgestorben (längste Beobachtungszeit).

c) Eine Kontrollzeit von 21 Wochen überlebten bei + 2°C alle auf Proteoseschrägagar überimpften Stämme, während von den bei 22°C gehaltenen und mit Paraffin verschlossenen Kulturen in der gleichen Zeit 3 "Pasteurella X"-Stämme (Nr. 18, 85 und 975) abstarben.

Die in diesen Versuchen geprüften Umweltseinflüsse auf die Überlebensfähigkeit der "Pasteurella X"- und Past. pseudotuberculosis-Stämme ließen keine sicheren Unterschiede erkennen. Sie zeigten somit, daß die "Pasteurella X"- und Past. pseudotuberculosis-Stämme in flüssigen und auf festen Medien wochenlang überleben, sofern die Kulturen vor dem Austrocknen geschützt sind.

Marlini (1938) und Meyer (1952) stellten sogar ein jahrelanges Überleben von Bast. pseudotuberculosis in verschlossenen Kulturen fest. Diese Beobachtungen bei "Pasteurella X" und Past. pseudotuberculosis stehen im Gegensatz zu den Erfahrungen mit Past. multocida-Stämmen. In bisher unveröffentlichter Versuchen sah Knapp, daß Past. multocida, bei 37°C in Proteoselösung gezüchtet und gehalten, 18 Wochen (längste Beobachtungszeit) überlebte, während die auf Blutagarplatten überimpften und bei Zimmer- oder Kühlschranktemperatur gehaltenen Kulturen schon in 10 bis 20 Tagen abstarben. Knapp empfiehlt daher, die Past. multocida-Stämme in Proteoselösung bei 37°C aufzubewahren und nur in Abständen von 3 bis 4 Monaten zu überimpfen.

2) Resistenz gegenüber Sulfonamiden und Antibiotika.

Verschiedene Autoren untersuchten in vitro und in vivo die Wirkung verschiedener Chemotherapeutika auf Past. pseudo-

tuberculosis. So stellte Berger (1957) fest, daß unter den Sulfonamiden nur Aristamid und Protocid eine schwache Bakteriostase ausüben. Unter den Antibiotika zeigte Penicillin keine sicher verwertbare Wirkung, während Terramycin, Neomycin, Achromycin und Streptomycin in vitro eine starke Hemmwirkung erkennen ließen. Berger stellte die deutliche Überlegenheit von Streptomycin gegenüber den anderen Antibiotika heraus, die zuvor von Knapp (1955) und später auch von Daniels (1963) gesehen worden war. Weniger wirksam fand Daniels (1963) die Antibiotika Tetracyclin, Chloromycetin, Neomycin, Polymyxin, Kanamycin und Vulcamycin. Als in vitro unwirksam erwiesen sich bei Daniels Novobiocin, Cathomycin, Erythromycin, Bacitracin und Oleandomycin sowie verschiedene Sulfonamide einschließlich Furadantin. Eine interessante Beobachtung von Daniels (1963) zeigte, daß die Stämme der verschiedenen serologischen Typen von Past. pseudotuberculosis eine unterschiedliche Resistenz gegenüber Penicillin haben sollen. Er fand Stämme vom Typ I und II empfindlicher als die von ihm untersuchten Typ III - Typ V Stämme. Polymyxin gab Percebois (1961) im Gegensatz zu Daniels als unwirksam gegenüber Past. pseudotuberculosis an.

Um festzustellen, ob Unterschiede in der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika zwischen den "Pasteurella X"- und Past. pseudotuberculosis-Stämmen bestehen, untersuchten wir unsere Stämme auf ihre Empfindlichkeit gegen verschiedene Antibiotika und Sulfonamide. Für unsere Versuche wählten wir den Ringtest nach Linzenmeier unter Verwendung der von ihm angegebenen zahnradförmig zugeschnittenen Testringe (Hersteller: Firma Schleicher & Schüll).

Bei der Resistenzbestimmung wurde folgendermaßen vorgegangen: Von den 24 Stunden bei 37°C bebrüteten Bouillonkulturen der einzelnen Stämme wurden je 1,0 ml auf 5,0 ml Proteoselösung übertragen. Von dieser Verdünnung wurden je 0,2 ml auf je eine Blutagarplatte übertragen und ausgespatelt. Anschließend wurden die trockenen Platten mit den

Testringen beschickt und 18 bis 24 Stunden bei 37°C bebrütet.

Die Art und Anzahl der geprüften Chemotherapeutika sind Tabelle II zu entnehmen, in die auch die Konzentration der einzelnen Präparate eingetragen ist.

Tabelle II

Ergebnisse der Resistenzbestimmung

| Präparat | Konzentration E/ | Anzahl und Herkunft der "Pasteurella X"-Stämme | | | | Past.pseudotuberculosis-Stämme |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 (Hässig) | 11 (Siegmann) | 10 (Daniels) | 14 (Becht) | 7 (Sammlung Hyg.Inst. Tübingen) |
| Penicillin | 2 E | R | R | R | R | R |
| Oleandomycin | 10 | + | R | R | 1++/13 R | R |
| Erythromycin | 10 | ++ | 1+ / 10 R | 9+ / 1 R | 13+/1 R | + |
| Inamycin | 10 | R | 4+ / 7 R | R | R | R |
| Streptomycin | 10 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Chloramphenicol | 40 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Tetracyclin | 40 | + | 8+ / 3 R | 4+ / 6 R | + | 5+ / 2 R |
| Kanamycin | 10 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Colistin | 100 | ++ | ++ | ++ | ++ | 4++/ 3 R |
| Furadantin | 40 | R | R | R | R | R |
| Protocid | 400 | ++ | 1+ / 10 R | R | 9+ / 5 R | + |
| Supronal | 400 | ++ | 9+ / 2 R | 1+ / 9 R | 13+ / 1 R | ++ |
| Durenat | 400 | + | R | 1+ / 9 R | 2+ /12 R | + |

Zeichenerklärung:

++ = gut empfindlich + = mäßig empfindlich R = Resistent

Unsere mit einer im Routinebetrieb angewandten Technik durchgeführten Resistenzbestimmungen, deren Ergebnis nur orientierende Bedeutung haben kann, ließen keine sicheren Unterschiede in der Empfindlichkeit der beiden Bakterienarten gegenüber den verschiedenen in Tabelle II (Seite 13) aufgeführten Präparaten feststellen. Es war zu erwarten, daß sich nicht alle Stämme derselben Species in ihrer Empfindlichkeit völlig gleich verhielten. Die bei der Resistenzbestimmung herausfallenden Stämme waren im Rahmen der anderen Untersuchungen unauffällig.

Die von Berger (1957) gegenüber Past. pseudotuberculosis angegebene Wirksamkeit von Protocid wurde von uns auch für die "Pasteurella X"-Stämme bestätigt. Dagegen konnten wir die von Daniels (1963) angegebene Unwirksamkeit verschiedener Sulfonamide und des Antibiotikums Erythromycin gegenüber "Pasteurella X"-Stämmen nicht bestätigen. Alle "Pasteurella X"- und Past. pseudotuberculosis-Stämme waren außerdem im Gegensatz zu den Beobachtungen von Daniels bei Past. pseudotuberculosis gegen Penicillin unempfindlich. Die starke Wirksamkeit von Streptomycin auf Past. pseudotuberculosis wurde auch für die "Pasteurella X"-Stämme bestätigt.

C. Wachstum auf festen Nährmedien.

Nachdem orientierende Versuche gezeigt hatten, daß verschiedene "Pasteurella X"-Stämme leicht bei 22°C und 37°C auf Nähr-, Proteose- und Blutagarplatten wachsen, wobei das Wachstum bei 37°C stärker als bei 22°C war, führten wir eingehendere Untersuchungen nur mit einigen wenigen Nährmedien durch. Ausgewählt wurden als Nährboden ohne hemmende Eigenschaften der Blutagar und als Nährmedien mit Hemmwirkung auf grampositive bzw. -negative Keime der Milchzuckersulfitagar nach Endo, der Desoxycholatcitratagar nach Leifson, das Laktose-Galle-

Medium nach Mac Conkey, der Wismut-Sulfit-Agar nach Wilson und Blair, der Tellurit-Blutwasser-Glycerolat-Agar nach Clauberg (Clauberg II) und das tellurhaltige Medium nach Morris.

Die Auswahl der festen Nährmedien für unsere Untersuchungen mit "Pasteurella X" wurde vor allem durch die Beobachtungen mit Past. pseudotuberculosis bestimmt, auf die kurz eingegangen werden soll. Diese Untersuchungen hatten gezeigt, daß Past. pseudotuberculosis bei 22°C auf Blutagar sehr gut züchtbar ist und in Glattform ohne Hämolyse wächst, während bei 37°C die Stämme wiederholt in Rauhformen dissoziieren (Knapp 1959). Auch auf Milchzuckersulfitagar zeigt Past. pseudotuberculosis ein gutes, ungehemmtes Wachstum, besonders bei 22°C. Die glatten, anfangs hellen und durchsichtigen, später leicht trüben Kolonien erreichen innerhalb 48 Stunden die gleiche Größe wie auf Nähr- und Blutagarplatten. Bei 37°C werden sie rasch rauh und zeigen einen Randsaum (Knapp 1959 u.a.).

Der Desoxycholatcitratagar nach Leifson (Bader 1950) wurde von Thal und Chen (1955) und Baltazard und Mitarbeitern (1956) für die Differentialdiagnose von Past. pestis und Past. pseudotuberculosis angegeben. Past. pseudotuberculosis soll nach Thal und Chen bei 37°C in großen, leicht gelblichen Kolonien unter gleichzeitiger gelblicher Verfärbung des Nährbodens wachsen, während Past. pestis ein gehemmtes Wachstum ohne Veränderung des Nährbodens zeigt. Knapp (1959) sah dagegen auch die von ihm untersuchten Past. pseudotuberculosis-Stämme im Wachstum leicht gehemmt. Eine Gelbfärbung von Nährboden und Kolonien, wie von Thal und Chen beschrieben, wurde von ihm nicht beobachtet. Mit Hilfe des Desoxycholatcitratagars gelang Daniels (1961) und Kampelmacher (persönl. Mitteilung, 1963) zum ersten Mal der Nachweis von Past. pseudotuberculosis aus menschlichen Stuhlproben.

Auf Wismut-Sulfit-Agar nach Wilson und Blair beobachtete Knapp (1959) nach massiver Beimpfung mit Past. pseudotuberculosis nur bei 22°C schwaches Wachstum, das aber bei 37°C ausblieb. Morris (1958), Daniels (1960, 1963) und Brzin (1963) berichteten schließlich, daß sich auf Nährböden mit Kaliumtellurit- bzw. Kaliumtellurit- und Antibiotikazusatz Past. pseudotuberculosis aus mischinfiziertem Material isolieren lasse. So sah Morris (1958) auf einem Nährboden, dem Novobiocin, Erythrocin und Kaliumtellurit zugegeben war, gutes Wachstum von Past. pestis und Past. pseudotuberculosis bei 22°C bis 30°C, während Past. pestis bei Temperaturen über 30°C gehemmt war. Schließlich berichteten Paterson und Cook (1963) über ein modifiziertes Medium nach Morris, das eine bessere Isolierung von Past. pseudotuberculosis aus Faeces ermöglichen soll.

Es lag daher die Frage nahe, ob auch "Pasteurella X" auf den oben genannten Medien gezüchtet werden kann oder ob besondere Beobachtungen in ihrem Wachstum gemacht werden können. Wir beimpften daher die verschiedenen festen Nährmedien mit einer 24 Stunden bei 37°C bebrüteten und anschließend 1 : 50 verdünnten Bouillonkultur. Das Wachstum wurde über 4 Tage bei 37°C beobachtet.

Folgende Beobachtungen wurden gemacht (siehe auch Tabelle III, Seite 19):

1) Blutagar:

Alle untersuchten "Pasteurella X"-Stämme wuchsen bei 37°C in hellgrauen glänzenden Kolonien ohne Hämolyse. Sie unterschieden sich anfänglich nicht von den gleichzeitig geprüften Past. pseudotuberculosis-Stämmen, die nach 4 Tagen Bebrütung bei 37°C einen deutlichen Randsaum zeigten, der bei den "Pasteurella X"-Stämmen fehlte. Einzelne Stämme zeigten nach 48 - 72 Stunden Rauh- und Intermediärformen. Die gleiche Beobachtung konnte nach Überimpfen der Stämme auf Nähr- und Endoagar gemacht werden.

2) Milchzuckersulfitagar nach Endo:

In ihrem Wachstum und Aussehen glichen die Kolonien der "Pasteurella X"-Stämme nach 16 Stunden Bebrütung bei 37°C denen von Salmonella typhi: sie waren hell, glasig und durchsichtig. Später färbten sie sich ohne Beteiligung der Umgebung leicht rosa. Der von Becht isolierte Stamm Nr. 200 (vom Hund) zeigte nur schwache Wachstumstendenzen. Nach Aussaat einer 24 stündigen Bouillonkultur konnten erst am vierten Bebrütungstage einzelne Kolonien nachgewiesen werden. Bei geringer Keimaussaat blieb das Wachstum auf Endoagar ganz aus.

3) Desoxycholatcitratagar nach Leifson (modifiziert nach Bader (1950):

Deutliche Unterschiede im Wachstum von "Pasteurella X" und Past. pseudotuberculosis waren auf dem Desoxycholatcitratagar nach Leifson festzustellen. Past. pseudotuberculosis wuchs nur in kleinen Kolonien. Die Koloniegröße nahm nach den ersten 24 Stunden und während der weiteren Bebrütungszeit nur wenig zu, wobei ein Stamm nur nach Aussaat der unverdünnten 24 stündigen Bouillonkultur zum Wachstum kam (Stamm Nr. 142).

Die "Pasteurella X"-Stämme wuchsen, von wenigen Ausnahmen abgesehen, auf dem Desoxycholatcitratagar ebenso gut wie auf Blutagar oder den Nährböden nach Endo und Mac Conkey. Besonders schwaches Wachstum zeigten die Stämme Nr. 2533 (Hässig), 200 (Becht, vom Hund) und 266 (Siegmann).

4) Laktose-Galle-Medium nach Mac Conkey:

Dieser Gallensalze enthaltende Agar (Difco Nr. B 75) hemmt vor allem grampositive Bakterien. Mit Hilfe von Neutralrot als Farbindikator und Laktose als Zucker ist außerdem eine differentialdiagnostische Abgrenzung der Laktose spaltenden Stämme möglich.

Auf diesem Nährmedium wuchsen die untersuchten "Pasteurella X"- und Past. pseudotuberculosis-Stämme in hellen, farblosen und durchsichtigen Kolonien, die sich von Salmonella-Kolonien nicht sicher unterscheiden ließen.

5) Wismut-Sulfit-Agar nach Wilson und Blair:

Auf diesem im Nachweis von Typhusbakterien bewährten Medium wuchsen alle "Pasteurella X"- und Past. pseudotuberculosis-Stämme bei 22°C und 37°C nicht.

6) Tellurit-Blutwasser-Glycerolat-Agar (Clauberg II-Medium):

Der Versuch, "Pasteurella X"-Stämme auf Clauberg II-Medium zu züchten, mißlang auch bei massiver Beimpfung des Nährbodens. Die Past. pseudotuberculosis-Stämme zeigten ein unterschiedliches Verhalten. Von 8 untersuchten Stämmen ließen sich 3 auf Clauberg II-Medium nicht züchten. Die übrigen 5 Stämme wuchsen in 48 - 72 Stunden zu unterschiedlich großen, schwarz glänzenden Kolonien aus, die denen von Corynebacterium xerosis ähnlich waren. Ein makroskopisch gut sichtbares Wachstum wurde erst nach etwa 48 Std. Bebrütung der Kulturen bei 37°C gesehen.

7) Pasteurellen-Agar nach Morris (1958):

Zu Bacto Tryptose-Agar (Difco Nr. B 64) wurden nach Morris (1958) die für Medium 1 angegebenen Antibiotika Novobiocin, Erythrocin sowie Kaliumtellurit hinzugegeben (Einzelheiten der Nährbodenzusammensetzung und -herstellung sind der Originalarbeit zu entnehmen).

Auf diesem Medium wuchsen (wie aus Tabelle III, Seite 19, ersichtlich) die "Pasteurella X"-Stämme im Gegensatz zu den untersuchten Past. pseudotuberculosis-Stämmen nicht. Past. pseudotuberculosis zeigte schon nach einem Tag ein Wachstum in hellen, farblosen und durchsichtigen Kolonien.
Eine Zusammenstellung der Untersuchungsergebnisse bringt Tabelle III (Seite 19).

Tabelle III

Wachstum auf festen Nährmedien

| Nährmedien (nach) | Anzahl und Herkunft der "Pasteurella X"-Stämme | | | | | Past.pseudo-tuberculosis-Stämme |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 (Hässig) | 11 (Siegmann) | 10 (Daniels) | 14 (Becht) | 3 (Frederiksen) | 8 (Sammlung Hyg.Inst. Tübingen) |
| Blutagar | + | + | + | + | + | + |
| Milchzucker-sulfitagar (Endo) | + | + | + | 13+/1-[1] | + | + |
| Desoxycholat-citratagar (Leifson) | (+) | 10+/1-[2] | + | 13+/1-[1] | + | 7(+)/1- |
| Laktose-Galle-Medium (Mac Conkey) | + | + | + | + | + | + |
| Wismut-Sulfit-Agar (Wilson und Blair) | - | - | - | - | - | - |
| Tellurit-Blutwasser-Glycerolat-Agar (Clauberg II) | - | - | - | - | - | 5+/3- |
| Medium 1 (Morris) | - | - | - | - | - | + |

Zeichenerklärung: + = gutes Wachstum (+) = schwaches Wachstum - = kein Wachstum

1) Becht Nr. 200 (vom Hund) 2) Siegmann Nr. 266

Nach unseren in Tabelle III (Seite 19) zusammengestellten Beobachtungen zeigten die "Pasteurella X"- und Past. pseudotuberculosis-Stämme auf den festen Medien, wie z.B. Blut-, Endo- und Mac Conkey-Agar, etwa gleich gutes und starkes Wachstum, während dieses auf Wismut-Sulfit-Agar nach Wilson und Blair ausblieb. Verschieden war das Wachstum der beiden Erregerarten auf den tellurhaltigen Medien nach Clauberg bzw. nach Morris. Das Wachstum aller "Pasteurella X"-Stämme war deutlich stärker gehemmt als das der Past. pseudotuberculosis-Stämme, von denen aber ebenfalls drei Stämme auf Clauberg II nicht zum Wachstum kamen. Auf Desoxycholatzitratagar nach Leifson wuchsen dagegen die Past. pseudotuberculosis-Stämme nur sehr schwach, sofern sie überhaupt zum Wachstum kamen, während das Wachstum der "Pasteurella X"-Stämme so gut wie auf Blutagar war.

## D. Biochemische Eigenschaften

Die Prüfung der biochemischen Eigenschaften der "Pasteurella X"-Stämme im Vergleich mit einigen Past. pseudotuberculosis-Stämmen erfolgte mit den in Tabelle IV (Seite 31) und V (Seite 33) aufgeführten Nährböden bzw. Reaktionen, auf deren Besprechung, sofern es sich um Routineuntersuchungen handelt, verzichtet werden kann. Nur einige neuere Untersuchungsverfahren sollen besprochen werden, zumal die von Devignat (1954), Knapp (1959, 1960, 1962), Percebois (1961), Mollaret (1962) und anderen Autoren zur Differentialdiagnose von Past. pseudotuberculosis, Past. pestis, Past. multocida und von Salmonella-Stämmen angegebenen biochemischen Untersuchungen durch die Einbeziehung weiterer, vor allem in den letzten Jahren für die Differentialdiagnose der Enterobacteriaceae angegebenen Nährböden und Untersuchungsverfahren eine Erweiterung erfahren haben. Ihre differentialdiagnostische Bedeutung sollte ge-

prüft werden.

Es handelt sich hierbei um Nährmedien bzw. Untersuchungsverfahren, die bisher zur Diagnose von Pasteurella-Stämmen und ihrer differentialdiagnostischen Unterscheidung von anderen Keimarten nicht oder nur in seltenen Fällen angewandt wurden. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in den Tabellen IV (Seite 31) und V (Seite 33) zusammengestellt. Vor seiner Besprechung soll kurz auf folgende Nährmedien bzw. Untersuchungsverfahren und ihre Bedeutung in der Diagnose von Past. pseudotuberculosis besonders eingegangen werden.

a) Aesculin:
Bei seinen Untersuchungen über die kulturelle Differentialdiagnose von Past. pseudotuberculosis und Past. pestis stellte Parnas (1961) fest, daß beide Species im Gegensatz zu Past. multocida, Brucella abortus, Brucella suis und Brucella melitensis, Salmonella enteritidis, Salmonella schottmülleri und anderen Salmonellen Aesculin spalten. Für seine Untersuchungen verwendete er Bouillon mit 1 % Aesculinzusatz und als Reagens eine Eisenchloridlösung. Seine Beobachtungen wurden von Mollaret (1961) bestätigt.

In unseren Untersuchungen, die der Klärung der Frage galten, ob die "Pasteurella X"- wie die Past. pseudotuberculosis-Stämme Aesculin spalten oder ein unterschiedliches Verhalten differentialdiagnostisch von Bedeutung werden könnte, sahen wir, daß die "Pasteurella X"-Stämme Aesculin nicht spalteten.

b) Malonat (nach Leifson 1933, modifiziert nach Ewing 1960):
Die Prüfung der Fermentation von Natriummalonat war zuerst von Leifson (1933) zur Differentialdiagnose von Aerobacter und Escherichia angegeben worden. Durch Zugabe geringer Mengen von Dextrose und Hefeextrakt modifizierte Ewing (1960) dieses Medium für die Differenzierung z.B. von Salmo-

nella- und Arizona-Stämmen sowie für die Unterscheidung von Stämmen der Gattung Klebsiella oder Aerobacter von solchen der Gattung Serratia.

Mollaret (1961, 1962) beobachtete, daß nur Past. pseudotuberculosis-Stämme vom Typ IV Natriummalonat und zwar bei Temperaturen von 18°C bis 28°C, aber nicht bei 37°C angreifen. Seine Beobachtungen konnten wir für unsere Typ IV-Stämme bestätigen, während andere Past. pseudotuberculosis- und alle "Pasteurella X"-Stämme Malonat nicht spalteten.

c) Urease:

Für Past. pseudotuberculosis ist bekannt, daß die meisten Stämme mit Hilfe des Fermentes Urease Harnstoff spalten (Gaillard 1950, Fauconnier und Chevalier 1950, Issaly 1950/53, Thal und Chen 1955, Mollaret 1961, 1962). Einzelne Ausnahmen wurden mitgeteilt, wobei die Anwendung nicht einwandfreier Untersuchungsverfahren nicht sicher auszuschließen ist. Nachdem unsere Vorversuche gezeigt hatten, daß bei der Verwendung der 1 %igen Harnstoffbouillon (Püschel 1936) nicht immer die gleichen Ergebnisse wie mit dem von Christensen (1946) angegebenen Harnstoffagar erzielt wurden, prüften wir die Harnstoffaktivität der "Pasteurella X"- und Past. pseudotuberculosis-Stämme mit beiden Verfahren.

Nach Püschel (1936) wird eine 1 %ige Harnstoffbouillon nach der Beimpfung 24 bis 48 Stunden bei 37°C bebrütet. Die auf dem freiwerdenden $NH_3$ beruhende Alkalisierung des Mediums wird durch seine Rotfärbung nach Zugabe von Phenolphthalein nachgewiesen. Christensen (1946) verwendete zum Nachweis der Harnstoffspaltung in seinem Harnstoffagar Phenolrot als Indikator. Nach Ewing (1960) werden die bei 37°C bebrüteten Kulturen 4 bis 6 Tage lang täglich auf einen Farbumschlag geprüft. Im positiven Fall führt die Alkalibildung zu einem Farbumschlag von gelb in rotviolett.

Mollaret (1962) stellte einen Farbumschlag des Harnstoffagars nach Christensen bei Past. pseudotuberculosis schon nach 20 stündiger Bebrütung der Kulturen fest.

In unseren eigenen Versuchen führten alle "Pasteurella X"- und Past. pseudotuberculosis-Stämme zu einer Harnstoffspaltung, die aber nicht in allen Fällen mit Hilfe der Harnstoffbouillon nachgewiesen wurde. Wir glauben, daß bei langsam und schwach harnstoffspaltenden Keimen die Harnstoffspaltung sicherer mit der Methode nach Christensen nachgewiesen werden kann, wobei die Kulturen nach Ewing mehrere Tage bebrütet und geprüft werden sollen.

d) KCN-Test:

Die Prüfung der verschiedenen Pasteurella-Stämme auf die KCN-Empfindlichkeit ihres Atmungssystems (Hallmann 1961) hatte gezeigt (Knapp 1959, Mollaret 1961), daß alle Past. pseudotuberculosis- und Past. pestis-Stämme in Gegenwart von KCN nicht wachsen. Im Gegensatz dazu zeigten unsere "Pasteurella X"-Stämme, wie aus Tabelle V (Seite 33) ersichtlich, ein unterschiedliches Verhalten. Das bakterielle Atmungssystem der einzelnen Stämme scheint demnach verschieden KCN-empfindlich zu sein.

e) ß-Galaktosidase (nach Le Minor und Ben Hamida 1961):

Nach Le Minor und Ben Hamida (1961) greifen zwei Enzymsysteme in den fermentativen Abbau der Laktose ein. So sollen die Permeasen die Laktose in die Zelle bringen, während die ß-Galaktosidase das Molekül Laktose in Glukose und Galaktose spaltet. Die Autoren prüften nur 4 Past. pseudotuberculosis-, 1 Past. haemolytica- und 2 Past. septica-Stämme. Der ß-Galaktosidasetest verlief bei den beiden erstgenannten Bakterienarten positiv und bei Past. septica negativ.

Bei der Untersuchung der "Pasteurella X"-Stämme wandten wir folgende Untersuchungstechnik an:

Eine 18 bis 24 Stunden auf Eisencitratagar nach Kligler bebrütete Kultur wurde mit 0,25 ml physiol. Kochsalzlösung abgeschwemmt, nach Zugabe eines Tropfens Toluol geschüttelt und einige Minuten im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt. Anschließend wurden 0,25 ml einer wie folgt hergestellten Orthonitrophenyl-ß-D-galaktopyranosid-Lösung zugegeben: 80 mg Orthonitrophenyl-ß-D-galaktopyranosid (ONPG) werden in 15 ml Aqu.dest. bei 37°C aufgelöst und anschließend 5 ml einer Pufferlösung (6,9 g $NaH_2PO_4H_2O$ in 45 ml Aqu.dest., mit NaOH auf pH 7 eingestellt) zugegeben. Die Gesamtmischung (ca. 0,5 ml) wird im Wasserbad bei 37°C gehalten und die Reaktion während 24 Stunden beobachtet. Eine positive Reaktion zeigt sich in einem Farbumschlag nach gelb, der z.B. bei Escherichia coli nach 20 Minuten eintritt.

Unsere Versuche, bei denen wir je 2 Salmonella- und Proteus-Stämme als negative und 1 Serratia marcescens- und 2 Escherichia coli-Stämme als positive Kontrolle verwendeten, zeigten, daß bei allen "Pasteurella X"-Stämmen mit Ausnahme von Stamm 2533 (Hässig) und Stamm 200 (Becht) der ß-Galaktosidasetest, wie bei Past. pseudotuberculosis angegeben, positiv ausfiel.

f) Prüfung von Oxydationsvorgängen (Katalase- Oxydase-Peroxydase-Teste).

1. Katalase:

Sie ist nach Hallmann (1961) ein Ferment, das ein Eisenporphyrin enthält und Wasserstoffsuperoxyd in Wasser und molekularen Sauerstoff spaltet. Ihr Nachweis ist nach Mollaret (1962) bei Past. pseudotuberculosis, Past. pestis und Past. septica möglich.

Bei der Untersuchung der "Pasteurella X"-Stämme auf Kataloseaktivität wurden von uns folgende zwei Methoden angewandt:

a) 5 ml einer 24 stündigen Trypsinbouillonkultur wurden nach Hallmann (1961) mit 3 ml einer 3%igen $H_2O_2$-Lösung

versetzt. Im positiven Fall stiegen sofort oder wenige Sekunden nach Zugabe des Wasserstoffsuperoxyds Gasblasen an die Oberfläche.
b) In ein Kahnröhrchen wurden nach Vischer und Tirunarayanan (1957) 1 ml Acetatpuffer pH 4,0, 0,2 ml 2 %ige Brenzkatechinlösung (in Aqu.dest.) und 0,1 ml 1:100 verdünntes Perhydrol (30% $H_2O_2$) und anschließend eine Öse einer Bakterienkultur gegeben. Katalasepositive Bakterien stiegen in wenigen Sekunden an die Flüssigkeitsoberfläche.

Mit beiden Methoden wurde bei allen geprüften "Pasteurella X"- und Past. pseudotuberculosis-Stämmen eine Katalaseaktivität nachgewiesen.

2. Oxydase und Peroxydase:

Von Hallmann (1961) werden die beiden Fermente wie folgt beschrieben: Die Oxydase soll ein Ferment sein, das Luftsauerstoff aktiviert, während die Peroxydase aus $H_2O_2$ einwertigen Sauerstoff freimacht. Bei beiden Reaktionen wird somit Sauerstoff frei.

Die Oxydase- und Peroxydaseaktivität der "Pasteurella X"-Stämme prüften wir mit folgenden Methoden:
Bei der Prüfung der Oxydasereaktion wird auf eine einzeln stehende Kolonie einer 24 bis 48 Stunden bebrüteten Agarplatte ein Tropfen einer 1 %igen Lösung von N-N-Dimethyl-p-phenylendiaminhydrochlorid oder einer 0,5 bis 1 %igen Lösung von Tetramethyl-p-phenylendiaminhydrochlorid gegeben. Zur Prüfung der Peroxydasereaktion wird außerdem noch ein Tropfen einer 3 %igen $H_2O_2$-Lösung aufgetropft. Statt des angegebenen Hydrochlorids verwendeten wir das Dihydrochlorid. Bei der Prüfung mit N-N-Dimethyl-p-phenylendiamindihydrochlorid färbten sich die positiven Kolonien anfangs rosa, später schwarz und bei Prüfung mit Tetramethyl-p-phenylendiamindihydrochlorid anfangs blau, später gleichfalls schwarz. Das zweite Reagens war sehr instabil, so daß es während der Untersuchung mehrmals erneuert werden mußte.

Sicher reproduzierbare Ergebnisse ermöglichte uns nur die Peroxydaseprüfung bei den Past. pseudotuberculosis-Stämmen. Wurden die Kulturen bei 37°C bebrütet, so fiel die Reaktion immer positiv aus, wurden die Kulturen parallel bei 22°C bebrütet, so verlief die Reaktion dagegen immer negativ. Dieses Ergebnis kann vielleicht dahingehend gedeutet werden, daß die Peroxydase nur von den bei 37°C bebrüteten Past. pseudotuberculosis-Kulturen gebildet wird und die Fermententwicklung somit temperaturabhängig ist. Unsere Untersuchungen mit den "Pasteurella X"-Stämmen führten dagegen zu keinen einheitlichen, gleichbleibend reproduzierbaren Ergebnissen.

g) Prüfung der Decarboxylaseaktivität:

Untersuchungen vor allem von Moeller (1954, 1955), Carlquist (1956), Falkow (1958), Bachrach (1959) und Ewing, Davis und Edwards (1960) haben gezeigt, daß die Fähigkeit, bestimmte Aminosäuren zu decarboxylieren, einige Bakterien-Gruppen, -Gattungen oder -Species differentialdiagnostisch voneinander abgrenzen läßt. Besonders eingehend wurde bisher bei Angehörigen der Familie der Enterobacteriaceae und einigen verwandten Keimarten die Fähigkeit, Lysin, Arginin und Ornithin zu decarboxylieren, untersucht.

Mit "Pasteurella X"-Stämmen wurden die ersten diesbezüglichen Untersuchungen von Knapp und Thal (1963) durchgeführt. Sie fanden in den noch nicht veröffentlichten Untersuchungen bei Anwendung der von Moeller (1955) angegebenen und von Ewing und Mitarbeitern (1960) als Standardmethode empfohlenen Untersuchungstechnik, daß alle 93 Past. pseudotuberculosis-Stämme Lysin und Ornithin nicht und nur ein Teil dieser Stämme Arginin decarboxylierte, während die 40 von ihnen geprüften "Pasteurella X"-Stämme nur Ornithin, aber nicht Lysin und Arginin decarboxylierten. Auf die fehlende Decarboxylierung von Lysin durch Past. pseudotuberculosis hatte schon zuvor Mollaret (1961) hingewiesen.

Da sich nach Ewing (1960) andere Methoden der Decarboxylaseprüfung, wie z.B. die Methode nach Falkow (1958) bei der Untersuchung von Keimen der Klebsiella- und Aerobactergruppe besonders bewährt hatten, prüften wir die Decarboxylaseaktivität unserer Stämme vergleichsweise mit den Verfahren von Moeller (1955), Carlquist (1956), Falkow (1958)und Bachrach (1959).

Die Durchführung der verschiedenen Teste erfolgte in der von Ewing (1960) und Edwards und Ewing (1962) empfohlenen und anschließend besprochenen Technik. Das Ergebnis dieser Untersuchungen wurde in den einzelnen Abschnitten kurz besprochen und in Tabelle IV (Seite 31 ) zusammengestellt.

1. Decarboxylase-Test nach Moeller (1955):

Das für diesen Test angegebene und aus Pepton, Fleischextrakt, Dextrose, Bromkresolpurpur, Kresolrot, Pyridoxal und dest. Wasser bestehende Grundgemisch - Mengenangaben siehe bei Ewing (1960) - wurde in 4 gleiche Teile geteilt. Drei Teile erhielten je eine Aminosäure, während der vierte Teil als aminosäurefreie Kontrolle diente. Bei den Aminosäuren handelte es sich um L-Lysindihydrochlorid, L-Argininmonohydrochlorid und L-Ornithindihydrochlorid in 1 %iger Konzentration. Statt L-Lysindihydrochlorid und L-Ornithindihydrochlorid verwendeten wir das jeweilige Monohydrochlorid,wie in den Difco-Mitteilungen (1961) angegeben.

Die verschiedenen Medien beimpften wir mit 48 Stunden alten Schrägagarkulturen. Anschließend wurden die Kulturen mit sterilem Paraffinöl überschichtet. Positive Reaktionen als Folge der Alkalisierung des Mediums zeigten sich in einem Farbumschlag von gelb über violett nach rötlichviolett. Negative Kulturen blieben gelb. Die Kontrolle der bei 37°C bebrüteten Röhrchen mit und ohne Aminosäure auf Farbumschlag erfolgte täglich über 4 Tage. Als weitere

Kontrollen dienten uns bei jedem Ansatz decarboxylase-positive und -negative Teststämme. Der Farbumschlag in den aminosäurefreien Kontrollen von dunkelgelb nach zitronengelb, wie er auch von Moeller angegeben wurde (1955), erfolgte sehr langsam. Ein weiterer Farbumschlag nach rötlich-violett trat bei diesen Kontrollen nicht ein.

Mit dieser Methode wurde auch von uns bei den "Pasteurella X"-, aber nicht bei den Past. pseudotuberculosis-Stämmen eine Ornithindecarboxylase nachgewiesen.

2) Lysin-Decarboxylase-Test nach Carlquist (1956):

Für diesen Test ist ein Medium mit folgender Zusammensetzung angegeben: 15 g pankreatisch verdautes Kasein, 2 g Dikaliumphosphat, 1 g Glukose, Aqu.dest. ad 1000 ml. Dieses flüssige Substrat wird nach Beimpfen 18 bis 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Anschließend werden unter gleichzeitigem starken Schütteln zuerst 1 ml 4 n NaOH und dann 2 ml Chloroform zugegeben; Cadaverin, ein Abbauprodukt des decarboxylierten Lysins, wird dabei in die Chloroform-Phase aufgenommen. Nach Zentrifugieren der Kultur werden 0,5 ml des Chloroformextrakts in ein Reagensglas gefüllt, dem 0,5 ml einer 0,1 %igen Ninhydrin-Chloroformlösung zugegeben werden. Dieses Gemisch wird bei Raumtemperatur beobachtet. Tritt innerhalb 4 Minuten eine dunkel purpurne Farbe auf, ist die Reaktion als positiv zu werten.

Als positive Kontrolle dienten uns Salmonella typhi-Stämme und als negative Shigella-Stämme. Der Nachweis einer Lysin-Decarboxylaseaktivität blieb für die "Pasteurella X"- und Past. pseudotuberculosis-Stämme aus.

3) Lysin-Decarboxylase-Test nach Falkow (1958):

Das verwendete Testmedium hat folgende Zusammensetzung: 5 g Bacto Pepton, 3 g Hefeextrakt, 1 g Dextrose, 5 g

L-Lysin, 0,02 g Bromkresolpurpur, Aqu.dest. ad 1000 ml, pH 6,5. Seine Farbe ist unbeimpft und bei positivem Reaktionsausfall lila, während sie bei negativem Verlauf des Testes gelb wird.

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir als positive Kontrolle einen Ballerup- und als negative Kontrolle einen Salmonella typhi-Stamm. Alle Ansätze wurden über 4 Tage beobachtet.

Für diesen Test sollen möglichst Röhrchen mit Schraubverschluß verwendet werden. Da sie uns nicht in ausreichender Zahl zur Verfügung standen, wurden in Vorversuchen einige Stämme parallel in Röhrchen mit Schraubverschluß, in normalen Reagensgläsern, wobei das Medium nach Beimpfung mit einer Schicht sterilem Paraffinöl überschichtet und die Stopfen paraffiniert wurden, sowie in Reagensgläsern untersucht, die nur mit einer Schicht Paraffinöl überschichtet wurden. Da alle Ergebnisse gleichsinnig waren und ein Lysin-Decarboxylasenachweis nicht gelang, führten wir die Untersuchungen in Reagensgläsern durch, die nach ihrer Beimpfung mit einer Schicht sterilem Paraffinöl abgedichtet wurden.

4) Lysin-Laktose-Test (Bachrach 1959, Difco Nr.0624):

Für das Testmedium wird folgende Zusammensetzung angegeben: 5 g Bacto Pepton, 3 g Bacto Hefeextrakt, 1 g Dextrose, 10 g Laktose, 5 g Bacto L-Lysin, 0,1 g Bromthymolblau. Mit diesem Medium sollen alle laktosenegativen und Lysin-Decarboxylase produzierenden Bakterien diagnostiziert werden, die zu einem Farbumschlag von grün nach blau führen. Bachrach empfiehlt den Test für die Differentialdiagnose von Salmonella- und Escherichia- und Klebsiella-Stämmen. Als positive Kontrollen wurden Salmonella paratyphi- und als negative Kontrollen Shigella-Stämme verwendet. Die Grundfarbe des Mediums war grün, im positiven Fall erfolg-

te Umschlag nach blau, im negativen nach gelb. Bebrütungsdauer der Kulturen 4 Tage bei 37°C. Bei Salmonella paratyphi trat der Farbumschlag nach 40 Stunden ein.

Unsere Versuche zeigen, daß mit allen 4 zum Lysin-Decarboxylasenachweis angegebenen Methoden bei "Pasteurella X" und Past. pseudotuberculosis keine Lysin-Decarboxylase nachzuweisen war.+)

---

+) In diese Untersuchungen wurde ein zweiter "Pasteurella X"-Stamm menschlicher Herkunft einbezogen, über den von Knapp und Thal (1963) an anderer Stelle berichtet wird.

Tabelle IV

Prüfung der Decarboxylaseaktivität

| Nährmedium | Anzahl und Herkunft der "Pasteurella X"-Stämme | | | | | | Past.pseudotuberculosis-Stämme |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 (Hässig) | 1 (Winblad) | 11 (Siegmann) | 10 (Daniels) | 14 (Becht) | 3 (Frederiksen) | 8 (Sammlung Hyg.Inst. Tübingen) |
| Moeller: | | | | | | | |
| Lysin Decarb. | - | - | - | - | - | - | - |
| Arginin Decarb. | - | - | - | - | - | - | - |
| Ornithin Decarb. | + | + | + | + | + | + | - |
| Carlquist: | | | | | | | |
| Lysin Decarb. | - | - | - | - | - | - | - |
| Falkow: | | | | | | | |
| Lysin Decarb. | - | - | - | - | - | - | - |
| Bachrach: | | | | | | | |
| Lysin Laktose Medium | - | - | - | - | - | - | - |

Zeichenerklärung: + = positiv - = negativ Erläuterungen s.Text S. 26 - 32

Wie aus Tabelle IV (Seite 31) ersichtlich, bestätigen diese Untersuchungen die Beobachtungen von Knapp und Thal (1963), daß die "Pasteurella X"-Stämme Ornithin decarboxylieren. Dagegen wurde von keinem der 8 Past. pseudotuberculosis-Stämme Arginin decarboxyliert. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu Knapp und Thal (1963), die ein unterschiedliches Verhalten ihrer 93 Stämme gegenüber Arginin feststellten.

Dieses unterschiedliche Ergebnis muß wohl mit der kleinen Zahl der von uns untersuchten Stämme erklärt werden. Unsere Untersuchungen zeigten weiterhin, daß mit den zur Prüfung der Lysin-Decarboxylase angegebenen Methoden übereinstimmende Ergebnisse erzielt werden können.

Vergleicht man die für "Pasteurella X" erhobenen Befunde mit den in der Literatur für Enterobacteriaceae und einige verwandte Bakterienarten angegebenen, so zeigt sich, daß innerhalb der Proteusgruppe Proteus mirabilis und Proteus morganii wie "Pasteurella X" allein Ornithin decarboxylieren und somit durch den Decarboxylase-Test und andere kulturell-biochemische Untersuchungen differentialdiagnostisch nicht sicher von "Pasteurella X" zu unterscheiden sind. Für eine differentialdiagnostische Unterscheidung empfehlen Knapp und Thal (1963) u.a. den Phenylalanindesaminase-Test. Im Gegensatz zu Stämmen der Gattung Proteus fehlt "Pasteurella X" und Past. pseudotuberculosis die Phenylalanindesaminase.

Tabelle V

Biochemische Eigenschaften

| Nährmedien und Untersuchungsverfahren | Anzahl und Herkunft der Stämme "Pasteurella X" | | | | Past.pseudotuberculosis |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1 (Hässig) | 11 (Siegmann) | 10 (Daniels) | 14 ( Becht) | 8 (Sammlung Hyg.Inst. Tübingen) |
| Adonit | - | - | - | - | ± |
| Dulcit | - | - | - | - | - |
| Sorbit | + | ± | + | + | - |
| Arabinose | + | + | + | + | + |
| Xylose | + | + | + | + | + |
| Rhamnose | - | - | - | - | + |
| Maltose | (+) | ± | + | + | + |
| Salicin | - | ∓ | ± | ∓ | + |
| Inosit | - | - | - | - | - |
| Laktose | - | - | - | - | - |
| Saccharose | + | + | + | + | - |
| Glukose | + | + | + | + | + |
| Mannit | + | + | + | + | + |
| Trehalose | + | + | + | + | + |
| Cellobiose | + | + | + | + | - |
| Raffinose | - | - | - | - | - |
| Aesculin | - | - | - | - | + |
| Inulin | - | - | - | - | - |
| Dextrin | + | + | + | + | + |
| Lackmusmilch,pH | 6,4 | 5,7 | 5,7 | 5,4-6,4 | 7,0 |
| Indol | - | - | - | - | - |
| $H_2S$ | - | - | - | - | - |
| Nitrat | + | + | + | + | + |
| Methylrot | + | + | + | + | + |
| V.Proskauer | - | - | - | - | - |
| Methylenblaured. 0,1% | + | + | + | + | + |
| Urease: | | | | | |
| n.Püschel | - | ∓ | ∓ | ∓ | ∓ |
| n.Christensen | + | + | + | + | + |
| Katalase | + | + | + | + | + |
| ß-Galaktosidase | - | + | + | + | + |
| KCN | - | ± | ± | ± | - |
| Malonat 22°C | - | - | - | - | - |
| 37°C | - | - | - | - | - |
| Gelatine | n.verfl. | n.verfl. | n.verfl. | n.verfl. | n.verfl. |

Zeichenerklärung:

+ = positive Reaktion (+) = schwach positiv - = negativ

± = positive Reaktion häufiger

∓ = negative Reaktion häufiger

n.verfl. = nicht verflüssigt

Das in Tabelle IV (Seite 31) und Tabelle V (Seite 33) zusammengestellte kulturell-biochemische Verhalten der von uns untersuchten Stämme zeigt, daß alle "Pasteurella X"-Stämme aus Arabinose, Xylose, Saccharose, Glukose, Mannit, Trehalose, Cellobiose und Dextrin Säure ohne Gas bilden und Adonit, Dulcit, Rhamnose, Inosit, Laktose, Raffinose, Aesculin und Inulin nicht vergären. Uneinheitlich war das Verhalten gegenüber Sorbit, Maltose und Salicin. Unter den von Siegmann isolierten Stämmen vergärten die Stämme Nr. 266, 612, 988 und 1100 Sorbit auch bei wiederholten Prüfungen nicht. Stamm Nr. 1100 und 709 führten außerdem zu keiner Säuerung von Maltose.

Das Wachstum der "Pasteurella X"-Stämme in KCN-haltigem Medium war im Gegensatz zu Past. pseudotuberculosis uneinheitlich.

Alle "Pasteurella X"-Stämme besaßen die Fermente Urease, ß-Galaktosidase, Katalase und Ornithin-Decarboxylase; Natriummalonat wurde nicht angegriffen. Sie reduzierten Nitrat und Methylenblau; Indol, $H_2S$ und Acetylmethylcarbinol wurden nicht gebildet und Gelatine nicht verflüssigt.

Diese Ergebnisse zeigen einzelne Unterschiede zu den Beobachtungen von Hässig (1949), Becht (1962), Daniels und Mitarbeitern (1963) und Daniels (1963). So wurde bei unseren Untersuchungen Sorbit im Gegensatz zu den Angaben von Hässig (1949) rasch gespalten, während Hässig eine verzögerte Reaktion sah. In der drei Wochen bei 37°C bebrüteten Lackmusmilch stellten wir im Gegensatz zu Hässig eine leichte Säuerung fest. Xylose wurde bei uns verzögert und bei Hässig nicht gespalten. Nach Becht (1962) wurde Sorbit von einigen Stämmen prompt und von anderen nicht abgebaut. Die sorbitnegativen Stämme sollen dagegen Maltose langsam spalten. Wir selbst sahen, daß alle Stämme von Becht Sorbit rasch und Maltose verzögert spalteten. Gegenüber Salicin, das nach Becht nicht gespalten wird, verhielten sich seine Stämme bei unseren Nachuntersuchun-

gen unterschiedlich. Inosit wurde nicht abgebaut. Schließlich fand Daniels (1963) seine Stämme Xylose und Salicin negativ. Bei der Nachuntersuchung vergärten aber alle Stämme Xylose, während sie sich gegenüber Salicin uneinheitlich verhielten.

E. Unterschiede im kulturellen und biochemischen Verhalten von "Pasteurella X" und Past. pseudotuberculosis.

Unsere Untersuchungen mit "Pasteurella X" und die Beobachtungen von Hässig und Mitarbeiter (1949), Becht (1962), Daniels und Mitarbeiter (1963) und Daniels (1963) lassen unter Berücksichtigung der schon vorliegenden Mitteilungen über die kulturell-biochemischen Eigenschaften von Past. pseudotuberculosis (Knapp 1959, Mollaret 1962, Knapp und Thal 1963, Daniels 1963 u.a.) die in Tabelle VI angeführten differentialdiagnostisch wesentlichen Unterschiede nachweisen.

Tabelle VI

Kulturelle und biochemische Unterschiede zwischen "Pasteurella X" und Past. pseudotuberculosis unter Einbeziehung der in der Literatur mitgeteilten kulturell-biochemischen Eigenschaften von Past. pseudotuberculosis.

| Feste/flüssige Medien | "Pasteurella X" 36 Stämme | Past.pseudotuberculosis 8 Stämme |
|---|---|---|
| Pasteurella-Agar (von Morris) | - | + |
| Clauberg II Medium | - | + |
| Desoxycholatcitratagar (nach Leifson) | + | (+) |
| Adonit | - | + |
| Sorbit | + | - |
| Saccharose | + | - |
| Rhamnose | - | + |
| Salicin | ± | + |
| Cellobiose | + | - |
| Aesculin | - | + |
| KCN | ± | - |
| Ornithin-Decarboxylase (nach Moeller) | + | - |

Zeichenerklärung:

\+ = Wachstum auf festen Medien und positive Reaktion im flüssigen Substrat

(+) = schwaches Wachstum

\- = fehlendes Wachstum auf festen Medien und Ausbleiben einer Reaktion im flüssigen Substrat

± = positive Reaktion häufiger

In der Tabelle blieben einzelne Ausnahmen unberücksichtigt (siehe Seite 34 und Tabelle III, Seite 19)

Unsere tabellarische Gegenüberstellung zeigt, daß die "Pasteurella X"-Stämme im Gegensatz zu den Past. pseudotuberculosis-Stämmen Adonit, Rhamnose und Aesculin nicht vergärten. Dagegen griffen die "Pasteurella X"-Stämme Sorbit, Saccharose und Cellobiose an und decarboxylierten die Aminosäure Ornithin.

Auf dem von Morris (1958) für die Isolierung von Past. pseudotuberculosis und Past. pestis angegebenen Nährboden mit Antibiotikazusatz wuchsen, wie auf Clauberg II, nur die Stämme von Past. pseudotuberculosis. Alle "Pasteurella X"-Stämme zeigten ein wesentlich stärkeres Wachstum auf Desoxycholatcitratagar als die von uns zum Vergleich geprüften Past. pseudotuberculosis-Stämme.

Somit zeigen die in Tabelle VI (Seite 36) zusammengestellten Befunde, daß im kulturell-biochemischen Verhalten zwischen "Pasteurella X" und Past. pseudotuberculosis Unterschiede bestehen, die diagnostisch und differentialdiagnostisch bei Stammisolierungen von an Pseudotuberkulose erkrankten Tieren berücksichtigt werden müssen.

Die Frage, ob sich die "Pasteurella X"-Stämme nach ihrem biochemischen Verhalten in verschiedene Gruppen einteilen lassen, konnte wegen der zu kleinen Zahl der bisher zur Verfügung stehenden Stämme von uns noch nicht beantwortet werden. Auffallend war, daß sich einige "Pasteurella X"-Stämme, wie z.B. Stamm Nr. 200, 266, 612, 709, 988, 1028, 1100 und 2533 in einzelnen kulturell-biochemischen Eigenschaften von den übrigen "Pasteurella X"-Stämmen unterschieden. Diese Stämme waren aber mit den übrigen Stämmen serologisch verwandt und wurden wie alle "Pasteurella X"-Stämme nicht durch den PST-Phagen (Knapp 1962, Becht 1962, Knapp und Thal 1963) lysiert.

F. Serologische Untersuchungen mit "Pasteurella X"-Stämmen:

Mit einigen wenigen Versuchen sollte die Frage beantwortet werden, ob zwischen allen uns zur Verfügung stehenden "Pasteurella X"-Stämmen der verschiedenen Herkunftsländer bzw. den Stämmen tierischer und menschlicher Herkunft antigene Beziehungen bestehen. Die ersten orientierenden Untersuchungen, die Knapp für Daniels, der die Ergebnisse veröffentlichte (1963), mit den Seren 722, 809 und 810 (s.S. 38) durchführte, hatten schon gezeigt, daß zwischen den "Pasteurella X"-Stämmen tierischer Herkunft von Daniels und einem Stamm menschlichen Ursprungs (Nr. 2533, Hässig) nahe antigene Beziehungen, aber wahrscheinlich keine völlige antigene Identität bestehen. Außerdem wurde von Daniels und Mitarbeitern (1963) und Daniels (1963) eine enge serologische Verwandtschaft zwischen den holländischen "Pasteurella X"-Stämmen nachgewiesen. Es war somit die weitere Frage naheliegend, ob diese nahe serologische Verwandtschaft auch mit den uns von Siegmann und Becht zur Verfügung gestellten Stämmen besteht.

Für die serologischen Untersuchungen standen folgende Sera - außer Nr. 2177 - aus der Sammlung von Prof.Knapp zur Verfügung:

| Art. u. Nr. des Serums | Stamm Nr. (Herkunft) | Art der Antigen Vorbehandlung u.Abtötung |
|---|---|---|
| O - 810 | 975 (Daniels) | $2^1/2$ Std. $100^oC$ |
| O - 705 | 268 (Siegmann) | $2^1/2$ Std. $100^oC$ |
| O - 725 | 2533 (Hässig) | $2^1/2$ Std. $100^oC$ |
| OH - 809 | 975 (Daniels) | $^1/2$ Std.$60^oC$, 0,25% Phenol |
| OH - 707 | 268 (Siegmann) | 0,5 % Phenol |
| OH - 722 | 2533 (Hässig) | 0,5 % Phenol |
| OH - 2177 | 18 (Becht) | 0,5 % Phenol |

Unser OH-Serum Nr. 2177 stellten wir in der üblichen Weise her. Ein Kaninchen wurde mit steigenden Antigenmengen im Abstand von 3 - 4 Tagen intramuskulär bzw. intravenös gespritzt. Nach 6 Wochen folgte eine Auffrischungsinjektion (booster dosis). Nachdem 8 Tage später im Serum eine ausreichende Agglutinintiterhöhe nachgewiesen wurde, entbluteten wir das Tier. Die Konservierung dieses Serums erfolgte mit Merthiolat (1 : 10 000).

In diesen Seren wurde die Agglutinabilität folgender 19 Stämme geprüft:
Becht Nr. 51, 57, 59, 85, 134, 151, 157; 200 (vom Hund)
Daniels Nr. 931, 1055, 1078, 1165; 1028 (vom Hasen)
Siegmann Nr. 988, 1154, 1100, 1524, 2737
Hässig Nr. 2533 (vom Menschen).

Bei diesen Untersuchungen wurde so vorgegangen, dass in jedem der zuvor aufgeführten Seren alle "Pasteurella X"-Stämme verschiedener Herkunft als lebende oder gekochte ($2^1/2$ Std. bei 100° C) Antigene agglutiniert wurden. Alle Seren wurden mit physiologischer Kochsalzlösung von 1:20 - 1:10 240 verdünnt. Nach Zugabe der verschiedenen Antigensuspensionen wurden die Antigen-Serummischungen in Wasserbäder (52° C) gestellt und die Reaktionen nach 16 bis 20 Stunden abgelesen.

Das Ergebnis der mit den lebenden und gekochten Antigenen kreuzweise durchgeführten Agglutinationen wird wegen der weitgehenden Gleichsinnigkeit nicht im einzelnen tabellarisch aufgeführt. Unsere Befunde können bisher dahingehend zusammengefasst werden, dass zwischen allen mit der Agglutinationsmethode serologisch untersuchten "Pasteurella X"-Stämmen antigene Beziehungen im O-Antigenkomplex bestehen; da alle 19 Stämme lebend oder gekocht in den oben (Seite 38) aufgeführten O- und OH-Seren -- wenn auch unterschiedlich stark -- agglutiniert werden. Zu der Frage, ob diese Stämme untereinander auch im H-Antigenkomplex antigene

Beziehungen haben oder ein Teil der Stämme eine identische H-Antigenstruktur besitzt, geben unsere Versuche noch keine Auskunft.

G. Tierexperimentelle Untersuchungen:

Als Ergebnis der Untersuchungen über eine eventuelle immunologische Wechselbeziehung zwischen seinen "Pasteurella X"-Stämmen und Past. pseudotuberculosis glaubte Becht (1962) "eine gewisse immunbiologische Verwandtschaft" zwischen den "Pasteurella X"-Stämmen und Past. pseudotuberculosis nicht ausschliessen zu können. Becht hatte u.a. 6 Meerschweinchen zweimal i.p. im Abstand von 2 Wochen mit einer 24 stündigen Bouillonkultur eines seiner Chinchillastämme immunisiert. Nach 2 Wochen erfolgte eine massive Infektion mit 1,0 ml einer Bouillonkultur von Past. pseudotuberculosis. Zwei Tiere starben wie das Kontrolltier nach 6 Tagen, während die übrigen Tiere 2 bis 6 weitere Tage überlebten.

Da die kleine Zahl der für diese Versuche verwendeten Tiere keine sicheren Rückschlüsse zulässt, versuchten wir die Frage, ob sich in Tierversuchen eine Kreuzimmunität zwischen "Pasteurella X" und Past. pseudotuberculosis sicher nachweisen lässt, durch Immunisierung einer grösseren Zahl von Meerschweinchen und Mäusen zu beantworten.

Immunisierungsversuche bei Meerschweinchen:

Für unsere Versuche verwendeten wir 8 Stämme von Daniels (Nr. 905, 975, 1028, 1046, 1054, 1055, 1078, 1165). Die Stämme wurden bei 22° C auf Proteoseschrägagar gezüchtet, den wir nach 24 Stunden mit je 10 ml physiologischer Kochsalzlösung abschwemmten. Mit je 1,0 ml Lebendkultur eines jeden Stammes wurden 3 Meerschweinchen (2 Tiere i.m., 1 Tier i.p.) zweimal im Abstand von 14 Tagen gespritzt.

Zum Teil waren die Tiere nach der Injektion des Lebendantigens 2 bis 3 Tage freßunlustig und zeigten struppiges Fell, ohne aber der Injektion der "Pasteurella X"-Stämme zu erliegen. Die Infektion mit dem virulenten Stamm Nr. $2^{I}$ von Past. pseudotuberculosis erfolgte 11 bis 12 Tage nach der Immunisierung.

Die Tatsache, daß alle 24 vorbehandelten Tiere wie die 6 Kontrolltiere, die nicht mit "Pasteurella X"-Stämmen vorbehandelt worden waren, etwa zur gleichen Zeit, d.h. innerhalb von 7 bis 15 Tagen starben und somit keine eindeutige Lebensverlängerung bei den mit "Pasteurella X"-Stämmen immunisierten Tieren nachgewiesen wurde, spricht gegen das Vorliegen einer Kreuzimmunität.

Immunisierungsversuche bei weißen Mäusen:

Entsprechende Versuche wurden mit 40 weißen Mäusen durchgeführt. Auch sie führten zu keinem Nachweis einer Lebensverlängerung der mit "Pasteurella X"-Stämmen vorbehandelten Tiere, so daß auf eine eingehende Besprechung der Versuche verzichtet wird. Für die Infektion der mit "Pasteurella X"-Stämmen immunisierten Tiere verwendeten wir einen Stamm von Past. pseudotuberculosis vom Typ I, der durch Meerschweinchen- und anschließende Mäusepassage für Mäuse virulent geworden war.

Bemerkenswert ist, daß wir bei 4 Meerschweinchen, die wir 14 Tage nach der Injektion des zur Immunisierung der Tiere verwendeten Lebendantigens zum Nachweis makroskopisch sichtbarer Veränderungen töteten und sezierten, makroskopisch keine Entzündungserscheinungen oder für die Pseudotuberkulose sprechende Organveränderungen nachweisen konnten. Diese Beobachtungen entsprechen den Mitteilungen von Daniels (1963). Dagegen sah Becht (1962) bei der Sektion von 4 Tieren das klassische Sektionsbild der Pseudotuberkulose. Welcher Infektionsdosis diese Tiere ausgesetzt waren, ist nicht bekannt.

## III. Stellungnahme zu den Untersuchungen und ihren Ergebnissen

Vor allem in den Jahren 1961/63 wurden in verschiedenen europäischen Ländern bei Chinchillas, die klinisch und pathologisch-anatomisch das Bild einer Pseudotuberkulose boten, Bakterienstämme gefunden, die zum Teil von ihren Erstuntersuchern als "Past. pseudotuberculosis" diagnostiziert worden waren. 40 dieser Stämme, davon 36 Stämme von Chinchillas, je 1 Stamm von einem Feldhasen und Hund und 2 Stämme vom Menschen standen dem Hygiene-Institut zu Untersuchungen zur Verfügung. Die Stämme waren dem Tübinger Institut und dem Staatlichen Veterinärmedizinischen Institut, Stockholm, 1962/63 entweder zu Nachuntersuchungen zugesandt oder auf Anforderung überlassen worden. Durch Vergleichsuntersuchungen sollte an beiden Instituten geprüft werden, ob diese in verschiedenen Ländern vor allem bei Chinchillas gefundenen Bakterienstämme in ihren morphologischen, kulturell-biochemischen, serologischen und immunbiologischen Eigenschaften übereinstimmen und welche Unterschiede sie gegenüber Past. pseudotuberculosis aufweisen. Diese Untersuchungen waren notwendig, da schon die ersten von Becht (1962), Daniels und Mitarbeitern (1963) und Daniels (1963) veröffentlichten Befunde nicht völlig übereinstimmten. Außerdem hatten die von Daniels und Mitarbeitern (1962/63) in Verbindung mit Knapp durchgeführten serologischen Untersuchungen gezeigt, daß möglicherweise die bei Chinchillas gefundenen Stämme mit den von Hässig und Mitarbeitern (1949) bei Menschen gefundenen zwei Stämmen übereinstimmten. Diese Stämme waren als Past. pseudotuberculosis beschrieben worden, obwohl die Autoren die kulturell-biochemischen und tierexperimentellen Unterschiede gegenüber Past. pseudotuberculosis festgestellt hatten.

Die in dieser Arbeit mitgeteilten Untersuchungen hatten vor allem die Aufgabe, die kulturell-biochemischen Eigen-

schaften dieser von Daniels (1963) vorläufig als "Pasteurella X" bezeichneten Bakterienstämme zu untersuchen und die differentialdiagnostisch wichtigen kulturell-biochemischen Unterschiede gegenüber Past. pseudotuberculosis festzulegen. In einigen wenigen, orientierenden serologischen Untersuchungen sollte schließlich die Frage beantwortet werden, ob zwischen allen an verschiedenen Orten gefundenen "Pasteurella X"-Stämmen antigene Beziehungen bestehen und die von Becht (1962) diskutierte immunbiologische Verwandtschaft mit Past. pseudotuberculosis durch Versuche an einer größeren Tierzahl bestätigt werden kann.

Unsere Untersuchungsergebnisse waren folgende:
"Pasteurella X" ist ein gramnegatives, pleomorphes Stäbchen, das keine Kapseln und Sporen bildet. Seine Form und Lagerung wird von der Nährbodenzusammensetzung, Bebrütungstemperatur und -dauer beeinflußt. Neben kokkoiden und ovoiden Organismen befinden sich in den Kulturen unterschiedlich lange, meist schlanke Stäbchen, deren Enden abgerundet sind. Eine stärkere Anfärbung der Pole, die als Gattungsmerkmal für die Gattung "Pasteurella" angegeben wird, konnte nicht als konstantes, diagnostisch sicher verwertbares Merkmal nachgewiesen werden. Somit ist "Pasteurella X" in seinen morphologischen Eigenschaften, worauf Becht (1962) zuerst hinwies, nicht von Past. pseudotuberculosis zu unterscheiden.

Bei allen Stämmen konnten wir eine Beweglichkeit bei 22°C, aber nicht bei 37°C nachweisen. Die "Pasteurella X"-Stämme verhielten sich somit in ihrer Beweglichkeit wie Past. pseudotuberculosis. Über die Art ihrer Begeißelung liegen noch keine Veröffentlichungen vor.

Unsere kulturell-biochemischen Untersuchungen zeigten ein weitgehend einheitliches Verhalten der von uns untersuchten 36 Stämme (Tabelle V, Seite 33). Die wenigen Unterschiede in unseren Untersuchungsergebnissen gegenüber den Beobachtungen von Hässig und Mitarbeitern (1949), Becht

(1962) und Daniels (1963) können mit der Verwendung nicht einheitlicher Nährmedien bzw. chemisch nicht reiner Substanzen oder mit verschiedenen Versuchsbedingungen, wie unterschiedlichen Bebrütungstemperaturen und -zeiten, erklärt werden. So prüfte Becht die kulturell-biochemischen Eigenschaften seiner Stämme nur über 1 Woche, während wir die Kulturen 3 Wochen beobachteten.

Eine differentialdiagnostische Unterscheidung von "Pasteurella X" und Past. pseudotuberculosis ist kulturell durch ihre unterschiedlichen Wachstumseigenschaften auf Desoxycholatcitratagar und tellurhaltigen Medien möglich (Tabelle III, Seite 19). Auf den tellurhaltigen Nährmedien nach Clauberg oder Morris wachsen die "Pasteurella X"-Keime nicht und auf Desoxycholatcitratagar im Gegensatz zu den Past. pseudotuberculosis-Stämmen sehr gut. Auf die Möglichkeit, Past. pseudotuberculosis-Stämme auf tellurhaltigen Medien zu isolieren, hatten außer Morris (1958) vor allem Daniels (1963), Brzin (1963) und Paterson und Mitarbeiter (1963) hingewiesen. Eine kulturell-biochemische Unterscheidungsmöglichkeit der beiden Keimarten in der "bunten Reihe" ist dadurch gegeben, daß "Pasteurella X", wie unsere eigenen Untersuchungen und die anderer Autoren (Hässig und Mitarbeiter 1949, Becht 1962, Daniels und Mitarbeiter 1963, Daniels 1963, Knapp und Thal 1963) ergaben, im Gegensatz zu Past. pseudotuberculosis Rhamnose, Aesculin und Adonit nicht, dagegen aber Saccharose spaltet und nach Knapp und Thal (1963) Ornithin decarboxyliert. Die von Parnas (1961) beschriebene und von Mollaret (1961, 1962) bestätigte Vergärung von Aesculin durch Past. pseudotuberculosis wurde von uns bei keinem "Pasteurella X"-Stamm nachgewiesen. Die vergleichsweise durchgeführten verschiedenen Methoden der Decarboxylase-aktivitäts-Prüfung (Moeller 1954, 1955, Carlquist 1956, Falkow 1958, Bachrach 1959 und Ewing, Davis und Edwards 1960) ließen die Methode von Moeller für Routineuntersuchungen am geeignetsten erscheinen. Mit ihr konnten wir

wie Knapp und Thal (1963) die Decarboxylierung von Ornithin durch alle "Pasteurella X"-, aber nicht durch Past. pseudotuberculosis-Stämme nachweisen.

Zur Frage der Tierpathogenität der "Pasteurella X"-Stämme leisten unsere Versuche nur insoweit einen Beitrag, als unsere Immunisierungsversuche mit verschiedenen lebenden Stämmen bei Meerschweinchen und Mäusen, wenn überhaupt, nur zu einer kurzen Erkrankung mit Freßunlust und struppigem Fell und zu keinen Organveränderungen führten. Die geprüften Stämme waren somit bei Meerschweinchen und Mäusen avirulent oder nur schwach virulent. Diese Beobachtungen stimmen mit denen von Hässig (1949) und Daniels (1963) überein, während Becht (1962) in einzelnen Fällen Organveränderungen sah.

Die serologische Verwandtschaft aller von uns untersuchten "Pasteurella X"-Stämmen verschiedener Herkunft konnte im kreuzweisen Agglutinationsversuch nachgewiesen werden. Diese Befunde stellen eine Erweiterung der Beobachtungen von Becht (1962) und Daniels (1963) dar. Die Autoren hatten bei den Stämmen ihres Heimatlandes serologische Beziehungen dieser Stämme untereinander festgestellt. Außerdem war durch Knapp in Untersuchungen mit Daniels (1963) die nahe serologische Verwandtschaft der holländischen "Pasteurella X"-Stämme mit dem von Hässig und Mitarbeitern (1949) beschriebenen Stamm menschlichen Ursprungs gezeigt worden.

Die Vermutung von Becht (1962), daß zwischen "Pasteurella X" und Past. pseudotuberculosis immunbiologische Beziehungen bestehen, wurde durch eigene Immunisierungsversuche an Meerschweinchen und Mäusen nicht bestätigt. Es gelang nicht, durch die Immunisierung der Tiere mit verschiedenen "Pasteurella X"-Stämmen eine Lebensverlängerung gegenüber einer Infektion mit einem virulenten Past. pseudotuberculosis-Stamm zu erreichen. Für den Nachweis einer Kreuzimmunität geben unsere Versuche somit keine experimentelle Grundlage.

## IV. Zusammenfassung

Es wurde über Untersuchungen berichtet, die mit 36 Stämmen einer vorläufig als "Pasteurella X" (Daniels) bezeichneten Bakterienart durchgeführt wurden. Von den untersuchten Stämmen stammten 33 von Chinchillas und je 1 Stamm von Hund, Hase und Mensch. Die Stämme hatten bei Tier und Mensch klinisch und pathologisch-anatomisch das Krankheitsbild einer Pseudotuberkulose hervorgerufen und waren zum Teil fälschlich als Past. pseudotuberculosis diagnostiziert worden, von der sie sich vor allem durch bestimmte kulturell-biochemische, serologische und tierexperimentelle Eigenschaften unterscheiden lassen.

Die mitgeteilten Untersuchungen beschränkten sich weitgehend auf die morphologischen, kulturellen und biochemischen Eigenschaften dieser Stämme und ihre diesbezügliche differentialdiagnostische Abgrenzung von Past. pseudotuberculosis. Serologische und immunbiologische Untersuchungen dienten dem Nachweis der antigenen Beziehungen zwischen allen "Pasteurella X"-Stämmen und dem Ausschluß immunbiologischer Beziehungen zu Past. pseudotuberculosis.

Die einzelnen Untersuchungsergebnisse wurden am Ende der jeweiligen Abschnitte mitgeteilt und am Schluß der Arbeit zusammenfassend besprochen.

## V. Literaturangaben


Bachrach, U.: An improved method for the determination of Lysine decarboxylase activity of Salmonellae. Amer.J.Clin.Path. 32, 580 (1959)

Bader, R.-E.: Vergleichende Untersuchungen mit einigen neueren Nährböden zur Isolierung von Salmonellen und Shigellen. Zs.Hyg.Infekt.-Kr.131, 157 (1950)

Bader, R.-E.: Persönliche Mitteilung (zit.bei Knapp **Ergeb.Mikrobiol. 32, 1959)**

Baltazard, M.u. Mitarbeiter : Recommended laboratory methods for the diagnosis of plague. Bull.Wld.Htlh.Org.14, 457 (1956)

Becht, H.: Untersuchungen über die Pseudotuberkulose beim Chinchilla. Deutsche Tierärztl.Wschr.,21, 626 (1962)

Berger, K.: Chemotherapieversuche an Pasteurella pseudotuberculosis. Inaug.-Diss. Tübingen (1957)

Brzin, B.: Growth of Pasteurella pseudotuberculosis on Tellurite media. Zbl. Bakt. 1 Orig. 189, 543 (1963)

Carlquist, P.R.: A biochemical test for separating Paracolon groups. J.bact.71, 339 (1956)

Christensen, W.B.: Urea decomposition as a means of differentiating Proteus and Paracolon cultures from each other and from Salmonella and Shigella types. J.Bact.52, 461 (1946)

Daniels, J.J.H.M., u.Daniels-Bosman, M.S.M.: Lymphadenitis mesenterialis, veroorzaakt door Pasteurella pseudotuberculosis, verlopend onder het beeld van acute appendicitis. Ned. T. Geneesk.104, 922 (1960)

Daniels, J.J.H.M., u.Daniels-Bosman, M.S.M.: De negatieve appendix en de lymphadenitis mesenterialis, veroorzaakt door Pasteurella pseudotuberculosis. Ned.T.Geneesk.104, 2377 (1960)

| | |
|---|---|
| Daniels, J.J.H.M.: | Persönliche Mitteilung an Prof.Knapp (1960) |
| Daniels, J.J.H.M.: | Enteral infection with Pasteurella pseudotuberculosis. Isolation of the organism from Human Faeces. Brit.Med.J., II, 997 (1961) |
| Daniels, J.J.H.M.: | Enterale infecties met Pasteurella pseudotuberculosis bij de mens. Thesis, Amsterdam 1963 |
| Daniels, J.J.H.M.: | Untersuchungen an als Pasteurella pseudotuberculosis diagnostizierten Stämmen von Chinchillas. Z.f.Veterinärmedizin, B.10,413 (1963) |
| Daniels, J.J.H.M. u. Goudzwaard, C.: | Enkele stammen van een op Pasteurella pseudotuberculosis gelijkend niet geidentificeerd species, geisoleerd bij knaagdieren. T.Diergeneesk, 88, 96 (1963) |
| Devignat, R.: | Comportement biologique et biochimique de Past.pestis et de Past.pseudotuberculosis. Bull.Org.mond.Santé) Bull.Wld.Hlth.Org. ) 10, 463 (1954) |
| Difco Manual | 9th ed.,Detroit,1,Michigan,USA (1953) |
| Difco-Laboratories (Nr.171) | Decarboxylase differential media for the Enterobacteriaceae. Detroit, 1961 |
| Ewing, W.H.: | Enterobacteriaceae. Biochemical Methods for group differentiation. U.S.Department of Health,Education and Welfare (Public Health Service) Atlanta, Georgia (1960) |
| Ewing, W.H., Davis,B.R. u. Edwards, Ph.R.: | The Decarboxylase-reactions of enterobacteriaceae and their value in taxonomy. Publ. Hlth.Lab.18, 77 (1960) |
| Ewing, W.H. u. Edwards, P.R. | Identification of Enterobacteriaceae. Minneapolis 15, Minnesota,2nd ed. (1962) |
| Falkow, S.: | Activity of Lysine Decarboxylase as an aid in the identification of Salmonellae and Shigellae. Amer.J.Clin.Path.29, 598 (1958) |

Fauconnier, J. u.Chevalier, A.: La décomposition de l'urée en milieu synthétique de Ferguson par Pasteurella pseudotuberculosis. Ann.Inst.Pasteur,79, 104 (1950)

Gaillard, J.: Unveröffentlichte Mitteilung (1950) zit. bei Mollaret (1962)

Girard, G.: Sur quelque nouveaux caractères différenciant les bacilles de la peste et de la pseudotuberculosis des Pasteurella. Ann.Inst.Pasteur,68, 476 (1942)

Girard, G.: Sensibilité des bacilles pesteux et pseudotuberculeux d'une part des germes du groupe coli-dysentérique, d'autre part aux bactériophages homologues. Ann.Inst.Pasteur,69, 52 (1943)

Girard, G.: Méthodes permettant de différencier Past.pestis de Past.pseudotuberculosis. Bull.Org.mond.Santé) Bull.Wld.Hlth.Org. ) 9, 645 (1953)

Habs, H.: Bakteriologisches Taschenbuch, 36. Aufl., J.A.Barth-Verlag, Leipzig, 1954

Hässig, A., Karrer, J. u. Pusterla, F.: Über Pseudotuberkulose beim Menschen. Schweiz.Med.Wschr.79, 971 (1949)

Hallmann, L.: Bakteriologie und Serologie. 3.Aufl., Stuttgart,Thieme-Verlag, 1961

Henriksen, S.D. u. Jyssum, K.: A study of some Pasteurella strains from the human respiratory tract. Acta path.Microbiol.Scand.,51, 354 (1961)

Issaly, I.S. Miravet de u. Issaly, A.S.: Determinacion cuantitative de la actividad ureasica de las pasteurellas. Rivista del Instituto Malbran,XV,395 (1950/1953)

Kempelmacher, E.H.: Briefl.Mitteilung an Prof.Knapp (1963)

Knapp, W.: Die diagnostische Bedeutung der antigenen Beziehungen zwischen Past.pseudotuberculosis und der Salmonella Gruppe. Zbl.Bakt.,I.Abt.Orig.164, 57 (1955)

Knapp, W.: Die Bedeutung mikrobiologischer Untersuchungen zur ätiologischen Abgrenzung der mesenterialen Lymphadenitis. Chirurg.26, 440 (1955)

Knapp, W.: Pasteurella pseudotuberculosis. Ergebn.Mikrobiol.32, 196 (1959)

Knapp, W.: Die Laboratoriumsdiagnose von Infektionen mit Past.pseudotuberculosis. Das Ärztl.Laboratorium, 7,197 (1960)

Knapp, W.: Untersuchungen mit Past.pseudotuberculosis- und Past.pestis-Phagen. Z.Hyg. 148, 375 (1962)

Knapp, W.: Unveröffentlichte Mitteilungen (1963)

Knapp, W. u. Thal, E.: Kurzmitteilung über kulturell-biochemische, serologische und immunologische Untersuchungen einer vorläufig als "Pasteurella X" benannten Bakterienart. 1.Intern.Arbeitstagung über Pelztierkrankheiten, Celle (1963)

Knapp, W. u. Thal, E.: Untersuchung über die kulturell-biochemischen, serologischen, tierexperimentellen und immunologischen Eigenschaften einer vorläufig als "Pasteurella X" bezeichneten Bakterienart. **Z.Bakt.I.,Orig.(im Druck)**

Leifson, E.: New Selenit enrichment media for isolation of typhoid and paratyphoid (Salmonella) bacilli. Amer.J.Hyg.24, 423 (1936)

Le Minor, L. u. Ben Hamida, F.: Avantages de la recherche de la ß-Galaktosidase sur celle de la fermentation du Lactose en milieu complexe dans le diagnostic Bacteriologique, en particulier des Enterobacteriaceae. Ann.Inst.Pasteur,102, 267 (1961)

Marlini: (1938) zit.nach W.Knapp (1959)

Meyer, K.F.: The Pasteurella. In Dubos:Bacterial and mycotic infections of man,1th and 2th ed.Philadelphia: Lippincott Comp. (1948/1952)

Moeller, V.: Activity determination of amino acid decarboxylases in Enterobacteriaceae. Acta path.microbiol.Scand.34,102(1954)

Moeller, V.: Distribution of amino acid decarboxylases in Enterobacteriacae. Acta path.microbiol.Scand.35,259(1954)

Moeller, V.: Simplified tests for some amino acid decarboxylases and for the Arginine dihydrolase system. Acta path.microbiol.Scand.36,158(1955)

Mollaret, H.H.: Contribution à l'étude des charactères biochemique de Pasteurella pseudotuberculosis. Ann.Inst.Pasteur,100, 685 (1961)

Mollaret, H.H.: Le Bacille de Malassez et Vignal, caractères culturaux et biochémiques. (Paris, 1962)

Mollaret, H.H. u. Le Minor, L.: Recherche de la ß-Galaktosidase chez les différentes Pasteurella et conséquences quant à leur taxinomie. Ann.Inst.Pasteur,102, 649 (1962)

Morris, E.J.: Selective media for some Pasteurella species. J.gen.Micobiol.19, 305 (1958)

Parnas, J.: L'épreuve esculinique dans le diagnostic de la peste et de la pseudotuberculose. Ann.Inst.Pasteur,100, 691 (1961)

Paterson, J.S. u. Cook, R.: A method for the recovery of Pasteurella pseudotuberculosis from Faeces. J.Path.Bact.85, 241 (1963)

Percebois, G.: Contribution à l'étude de Cillopasteurella pseudotuberculosis (Bacille de Malassez et Vignal). Nancy, Imprimérie Georges Thomas (1961)

Püschel, J.: Harnstoffzersetzung als Unterscheidungsmerkmal zwischen Diphterie- und Pseudodiphteriebakterien. Klin.Wschr.XV, 375 (1936)

Thal, E. u. Chen, T.H.: Two simple tests for the differentiation of plague and pseudotuberculosis bacilli. J.bact.69, 103 (1955)

Vischer, W.A. u. Tirunarayanan, M.O.: Die Bedeutung der Peroxydaseaktivität bei Mycobakterien. Schweiz.Z.Tuberk.Pneumonlg.14, 243 (1957)

Herrn Professor Dr.med. R.-E. B a d e r möchte ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und die Möglichkeit, während meiner Tätigkeit als Medizinalassistentin am Hygiene-Institut die experimentellen Untersuchungen durchführen zu können, sehr herzlich danken.

Mein weiterer herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr.med. W. K n a p p für die Überlassung des Themas und die wiederholte Anleitung und eingehende Beratung.

# Lebenslauf.

Am 9. Oktober 1936 wurde ich in Schleswig geboren als Tochter des Kaufmannes Adolf Struve und seiner Ehefrau Anne-Marie, geb. Jepsen.

Kindheit und Jugend verbrachte ich zusammen mit meinem drei Jahre jüngeren Bruder in meinem Elternhause in Schleswig. Von Herbst 1943 bis Ostern 1950 besuchte ich dort die Volksschule.

Ostern 1950 machte ich die Aufnahmeprüfung für die Lornsenschule, einem staatlichen Gymnasium für Mädchen in Schleswig, an der ich am 26. Februar 1957 das Abitur bestand.

Im Sommersemester 1957 begann ich mit dem Medizinstudium an der Tübinger Universität, ging im Sommer 1958 für ein Semester nach Freiburg und machte im Herbst 1959 nach fünf vorklinischen Semestern das Physikum in Tübingen.

Die klinischen Semester mit Ausnahme des siebten, das ich in Kiel studierte, war ich ebenfalls in Tübingen, wo ich am 13. Dezember 1962 nach sechs klinischen Semestern das Staatsexamen bestand.

Vom 15. Januar 1963 bis 31. Juli des gleichen Jahres war ich am Hygiene-Institut der Universität Tübingen als Medizinalassistentin angestellt.